

Comité scientifique et technique du caoutchouc
CSTC - IRCA/CIRAD Procès-verbal de la 15ème
réunion tenue à Paris le 14 mars 1990
IRCA/CIRAD



Institut de Recherches sur le Caoutchouc

*Département du Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)
42, rue Scheffer 75116 Paris (France) - Tél. : (1) 47.04.32.15*

Télex : 620871 INFRANCA PARIS

PHYSIOLOGIE MOLECULAIRE

A LA RECHERCHE DES MECANISMES MOLECULAIRES LIES A LA PRODUCTION

J.L. Jacob

Le bilan des études physiologiques réalisées à l'IRCA montre l'importance des connaissances qu'elles ont induites et les progrès au plan appliqué qu'elles ont permis.

Une certaine modélisation du système laticifère a pu être établie qui est utile à l'exploitation et à l'amélioration.

A ce titre la méthodologie du diagnostic latex, outil au service du planteur mais aussi du chercheur qui teste de nouveaux systèmes d'exploitation est à souligner.

En outre, la définition d'une typologie de fonctionnement des différents clones d'hévéa a aidé à mieux comprendre les mécanismes de production qui les caractérisent, et à orienter les modes de saignée et de stimulation qui doivent leur être appliqués.

Les résultats acquis ne sont pourtant qu'une étape, et les progrès à réaliser, dans tous les domaines, probablement insoupçonnés. Comme tous les progrès, ils sont générés essentiellement par la connaissance et c'est dans ce domaine que la physiologie peut et doit apporter son appui.

L'effort cognitif réalisé à ce jour doit donc se poursuivre. L'évolution des techniques donne à ce titre des possibilités nouvelles dont l'intérêt est fondamental. C'est le cas de la Biologie Moléculaire.

Les recherches en physiologie menées jusqu'à présent ont porté sur l'analyse des grandes voies métaboliques et de leur régulation. Les recherches d'enzymes-clefs, l'étude de leur fonctionnement, des effecteurs susceptibles de contrôler leur activité *in situ* ont conduit à préciser des paramètres biologiques dont le rôle dans les mécanismes impliqués dans la production est relativement bien perçu.

Mais l'activité d'une enzyme est aussi dépendante de sa synthèse et de sa régénération au cours du temps, autrement dit de son expression par le génome. Les techniques de biologie moléculaire permettent d'aborder ce domaine qui comporte plusieurs étapes.

La première est la transcription du message contenant "l'ordre" de synthèse, de l'ADN nucléaire à l'ARN messager.

L'extraction de ces ARN, leur séparation par électrophorèse et leur analyse à l'aide de sondes correspondant à des enzymes connues (méthode de Northern Blott) permet d'évaluer qualitativement et semi-quantitativement l'expression de ces enzymes (fig.12 et 13).

La seconde étape correspond à la traduction de l'ARN messager en protéines enzymatiques ou non. Les ARN messagers sont incubés en présence de radiomarqueurs (^{35}S par exemple) dans un milieu leur permettant d'induire les synthèses protéiques qu'ils codent. L'analyse des protéines marquées obtenues se fait par électrophorèse bidimensionnelle couplée à la radiochromatographie.

Figure 12

Deux techniques permettant de mesurer l'expression de l'information génomique : à gauche, au niveau des ARN messagers, à droite au niveau de leur traduction en protéines.

TECHNIQUES UTILISEES
EN PHYSIOLOGIE MOLECULAIRE

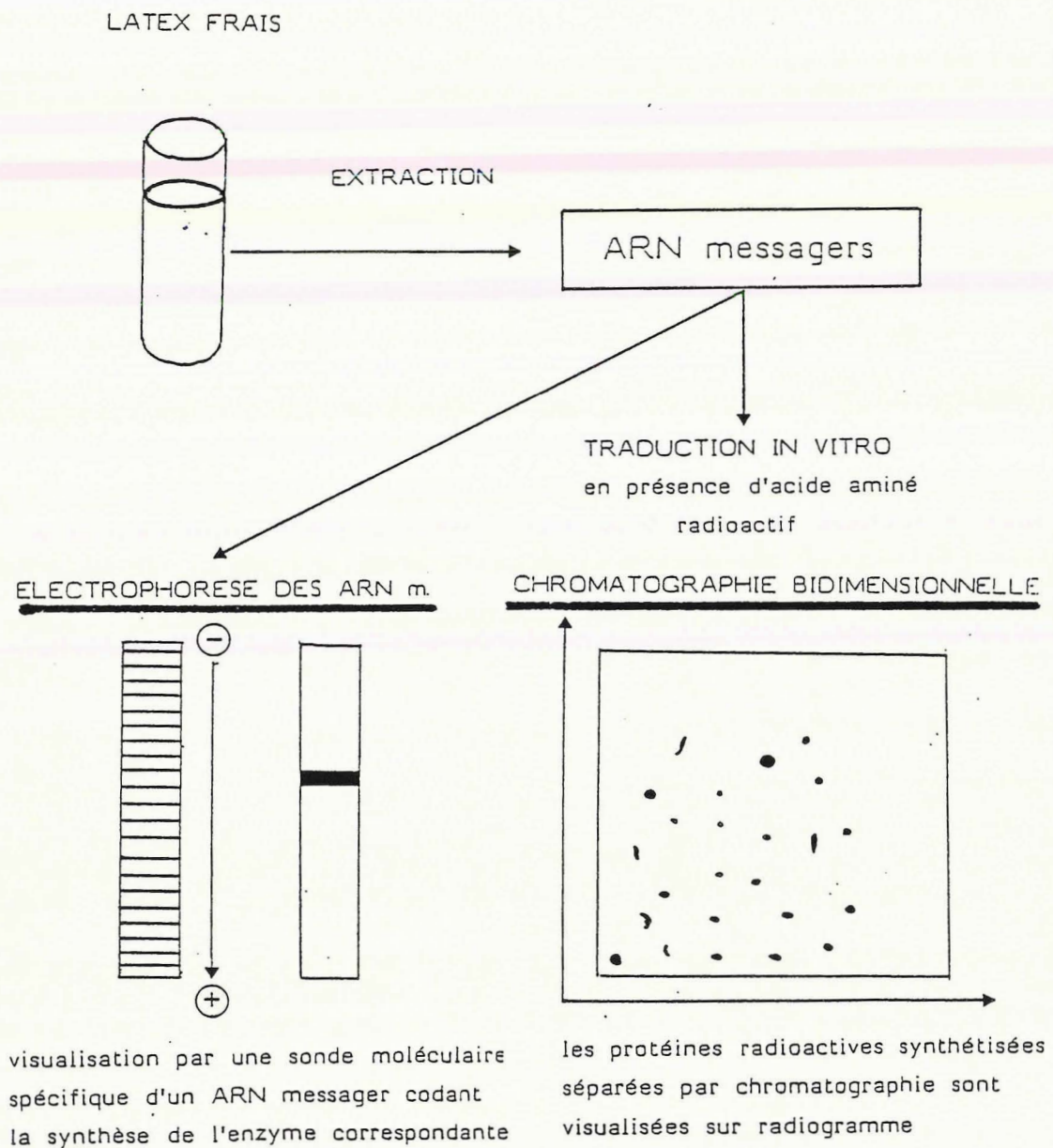
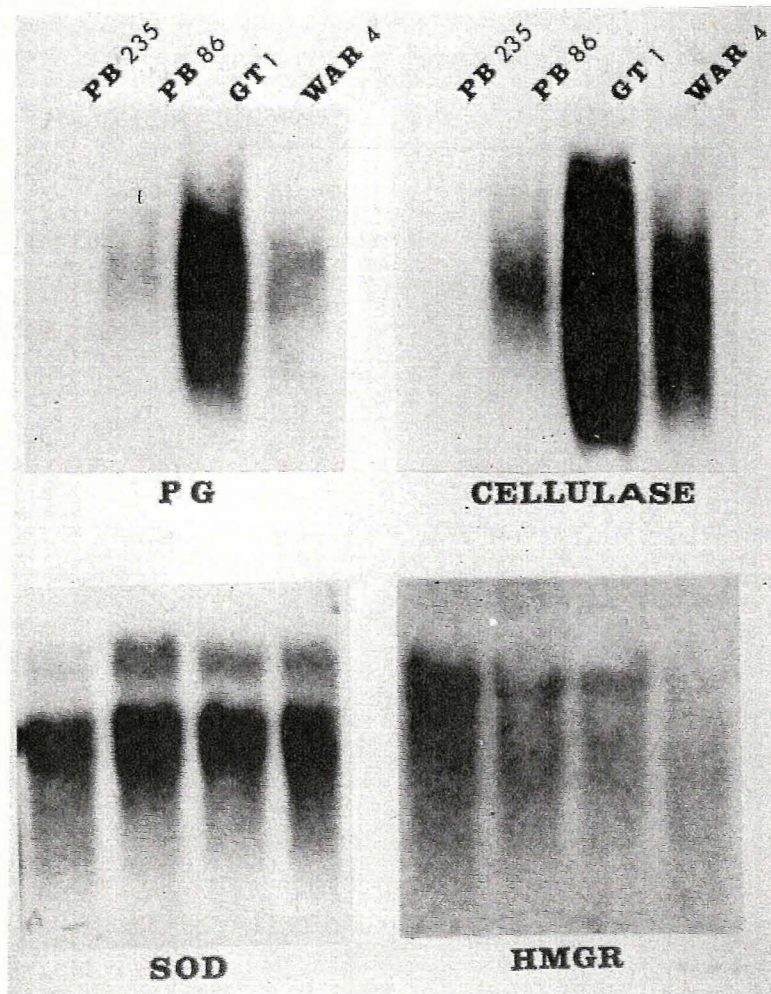


Figure 13

Caractérisation par "Northern Blott" de la quantité d'ARN messenger disponible dans le latex pour la production de 4 enzymes (PG: polygalacturonase, cellulase, SOD : superoxydedismutase, HMGR : HMG-CoA réductase). Des sondes radioactives de c-DNA correspondant à ces 4 enzymes ont été testées sur les RNA messagers provenant de 4 clones (PB 235, PB 86, GT1, WAR 4). L'intensité de la coloration traduit la quantité d'ARN messenger présente. Ainsi le clone GT1 est nettement plus riche en PG et cellulase, le clone PB 235 est plus riche en HMGR. (Résultats de X.Gidrol et A. Kush, Bimbresso-Singapour, Decembre 1989).



La reconnaissance des molécules protéiques peut mettre en jeu des techniques immunologiques (fig.14).

La troisième étape post-traductionnelle n'est pas toujours nécessaire, et ne concerne que les molécules enzymatiques qui, synthétisées sous forme inactive, doivent être modifiées biochimiquement (phosphorylation ou glycosylation par exemple) pour devenir fonctionnelles.

Pour résumer, trois niveaux de régulation peuvent être impliqués dans l'expression des activités enzymatiques potentielles. Une régulation transcriptionnelle, une régulation traductionnelle et enfin une régulation post-traductionnelle.

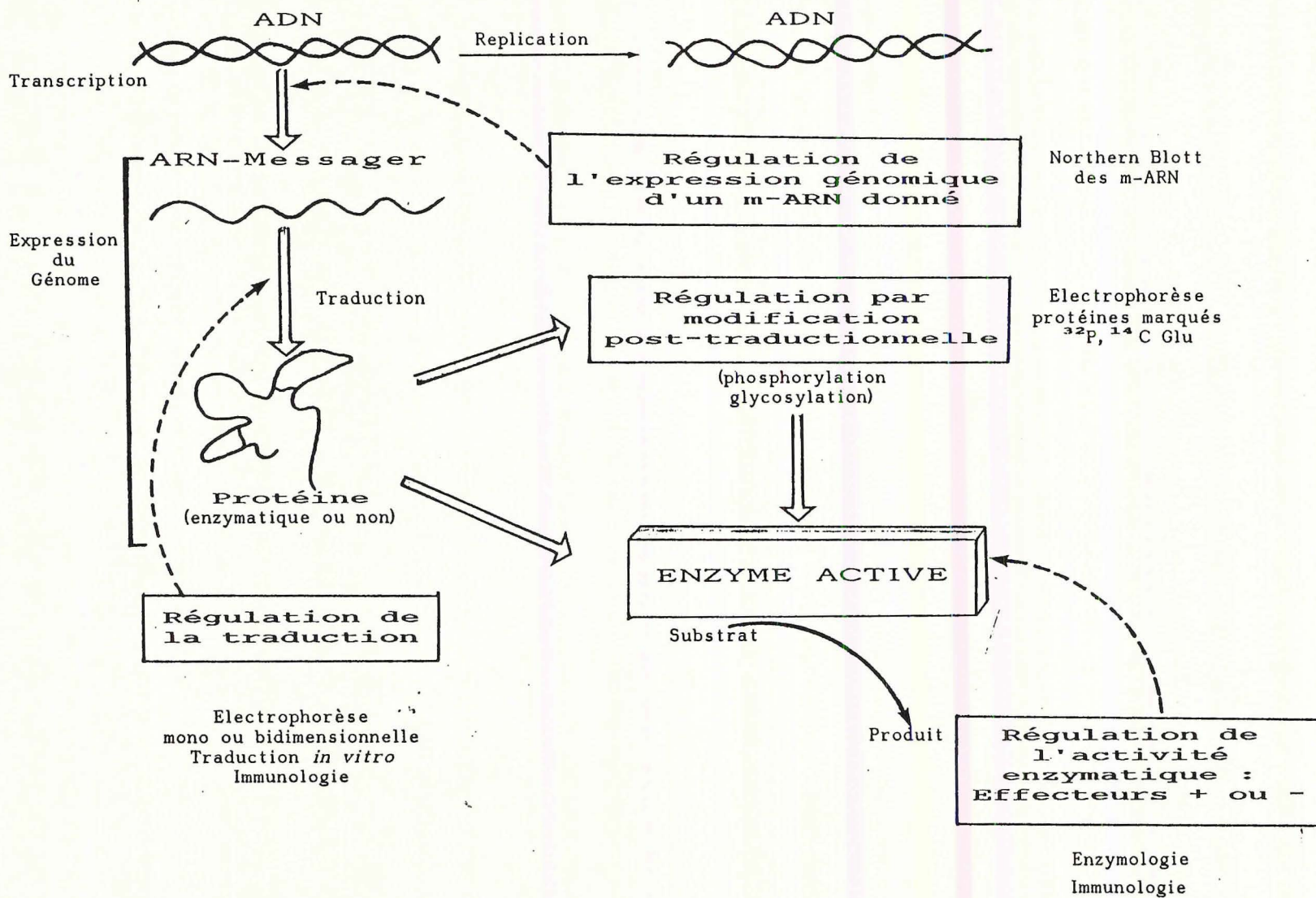


Figure 14 : Les différentes possibilités de régulation d'une enzyme donnée dans le latex : Régulation au niveau de l'expression, de la traduction et de l'activité enzymatique elle même.

Il est évident que les facteurs agissant sur la production doivent être étudiés dans ce cadre de manière à connaître le type de contrôle qu'ils influencent et partant de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. Il est possible aussi d'envisager la définition de marqueurs spécifiques de telle ou telle situation physiologique en relation directe ou non avec la production.

Un certain nombre de problématiques physiologiques, qui peuvent utiliser avec fruit cette nouvelle approche, sont déjà envisagées sinon étudiées.

C'est le cas de la stimulation par l'éthylène des systèmes laticifères et de la production. De nombreuses recherches préalables, au plan enzymologique et biochimique, ont permis de préciser les mécanismes métaboliques impliqués et dans une certaine mesure leur cinétique. Ainsi le pH cytoplasmique s'accroît tandis que le pH intralutoïdique diminue, signe d'une activation des pompes à protons membranaires, confirmée d'ailleurs par l'augmentation de l'activité ATPase tonoplastique. Les teneurs en sucre montent, reflet de l'effet sink induit et l'indice de plugging chute traduisant un transfert eau-solutés accru vers les laticifères.

La synthèse de RNA et l'indice de polymérisation des ribosomes qui augmentent, sont aussi représentatifs de l'activation métabolique générale observée.

L'étude entreprise visant à analyser l'action de la stimulation par l'éthylène au niveau de l'expression génomique va permettre de confirmer certains résultats (activation de la synthèse des pompes à protons par exemple) mais surtout d'apporter des données nouvelles à un niveau complémentaire et plus précis.

Ainsi l'influence de l'éthylène sur la synthèse protéique tant quantitative que qualitative par l'intermédiaire de la traduction des ARN messagers avant et après traitement à l'Ethrel, peut donner des informations utiles et dynamiques sur les processus biologiques fondamentaux qui interviennent dans le phénomène de stimulation. En outre, la mise en évidence de protéines spécifiques dont la synthèse serait liée à l'application d'agents stimulants, pourrait être utilisée à titre de marqueur.

Par ailleurs, il est indispensable de connaître l'effet de l'influence de l'éthylène en fonction du temps sur l'expression génomique. La dérégulation ou la répression de certaines enzymes joue un rôle fondamental dans ce domaine. L'analyse des ARN messagers et leur examen à l'aide de Northern Blott permettront grâce aux sondes dont il sera possible de disposer, de savoir quelle(s) activité(s) enzymatique(s), quand et dans quelle proportion elle(s) a(ont) été modifiée(s) au niveau transcriptionnel. Les résultats obtenus généreront une connaissance plus précise et plus fine des mécanismes impliqués par la stimulation et des systèmes de régulation mis en jeu, mais partant une maîtrise plus sûre des traitements stimulants et peut-être des innovations dans ce domaine.

D'autres problèmes physiologiques liés à la production de l'hévéa peuvent être étudiés et éclairés grâce à l'utilisation de la biologie moléculaire dans une approche analogue à la précédente.

C'est le cas de la montée en production observée lors de "l'ouverture" des arbres ayant atteint la taille requise pour être exploités. Plusieurs saignées sont nécessaires pour que la quantité de latex produit, faible les premières fois, augmente et devient satisfaisante. Il y a, durant ce temps, une accélération de l'activité métabolique, directement liée à la production. L'analyse de l'expression génomique au niveau de

la transcription,
la traduction des ARN messagers,
des molécules protéiques synthétisées,

devrait permettre d'identifier des marqueurs intéressants et notamment de mettre en évidence la surexpression ou la dérégulation d'enzymes dont il serait alors plus facile d'estimer l'importance dans les mécanismes liés à la production.

L'étude de la typologie de fonctionnement des laticifères peut également être abordée dans une même optique et avec une méthodologie semblable. Il serait en effet très souhaitable de connaître les systèmes enzymatiques ou protéiques qui sont responsables ou qui sont des marqueurs majeurs de l'activité métabolique globale caractérisant tel ou tel clone et sa potentialité à produire. L'analyse comparée, mettant en jeu les techniques précédemment évoquées, entre clones typologiquement opposés ou entre hévéas hauts et bas producteurs, apportera sûrement des réponses utiles dans ce domaine pour la définition de critères de la haute production.

Un dernier exemple a trait à l'encoche sèche. De nombreux travaux réalisés par diverses équipes et un récent Workshop international n'ont pas permis de conclure quant à la nature et au(x) facteur(s) responsable(s) de ce syndrome. Il y a probablement plusieurs causes possibles telles que la fatigue physiologique induite par la surexploitation ou un facteur pathogène qui pourrait exprimer sa virulence à la suite de divers stress.

Les méthodologies de biochimie cellulaire classique ont donné quelques informations concernant notamment l'encoche sèche de surstimulation.

Par contre, l'hypothèse hautement probable d'un pathogène de type viral ou viroïde n'a pu être prouvée malgré les nombreux et rigoureux efforts de plusieurs équipes françaises ou étrangères. Les techniques de biologie moléculaire sont infiniment mieux adaptées pour tester cette possibilité, et mettre en évidence la présence de l'ARN du pathogène évoqué, des sondes adéquates pouvant être utilisées.

Ne nous y trompons pas, la biologie moléculaire ne résout pas tout mais, c'est un outil à l'efficacité surprenante qui ouvre à la Biologie et à la Physiologie Végétale des voies nouvelles à la connaissance. La physiologie cellulaire a beaucoup apporté et apportera encore beaucoup mais une discipline nouvelle complémentaire encore plus performante, plus explicative est née : la Physiologie Moléculaire.